CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU CHAMPIGNON SYMBIOTE DE QUELQUES FOURMIS DE LA TRIBU ATTINI

par H. DECHARME et M. ISSALY*

RÉSUMÉ. — Une étude cytologique du champignon symbiote de trois espèces de fourmis attines, *Atta sexdens, Atta cephalotes, Atta octospinosus*, est effectuée en microscopie optique. Les champignons des trois origines présentent les mêmes caractéristiques, qu'ils soient observés en culture ou en place sur les fragments végétaux du nid. Les hyphes sont constituées d'articles de 6 à 7μm de diamètre comportant de nombreux noyaux. Les *gongylidia* se constituent à l'extrémité de ramifications d'hyphes non séparées du filament d'origine par une cloison et sont plus ou moins vacuolisés suivant leur degré d'évolution. Les *gongylidia* sphériques les plus évolués ont un diamètre de l'ordre de 45μm, leur lumière est occupée par une énorme vacuole plaquant contre la paroi de nombreux noyaux. L'étude de l'ARN montre que la plupart des *gongylidia* développés à la surface des fragments végétaux de la meule sont des structures jeunes. Les noyaux de petites dimensions présentent 4 chromocentres. Le matériel de réserve constitué par du glycogène est abondamment mis en évidence et pose le problème de sa dégradation au sein du tractus digestif de la fourmi.

ABSTRACT. — A cytological study of the symbiotic fungus of three species of ants, *Atta sexdens, Atta cephalotes, Atta octospinosus*, is made with a light microscope. The fungus from those three species shows the same characteristics in vitro or in situ. Hyphae have a 6-7 microns diameter with a lot of nuclei. The *gongylidia* are produced at the end of the hyphae which have not been separated from the originel filament and are more or less vacuolised, according to their degree of evolution. The most evoluated spherical *gongylidia* are about 45 microns in diameter, and their whole part is filled with an enormous vacuole rejecting a lot of nuclei against the wall-cell. The study of RNA shows that most of the *gongylidia*, which have developed on the surface of vegetal material in the garden, are young structures. The smaller nuclei have 4 chromocenters. We can see that we have brought to light the importance of the storage made up of glycogen; it raises the problem of its degradation in the alimentary canal of the ant.

* École Nationale Supérieure d'Horticulture, Versailles.

INTRODUCTION

Les fourmis champignonnistes appartiennent toutes à la tribu *Attini (Formicidae)* dont l'aire de répartition se situe dans les zones tropicales et subtropicales américaines. Leur particularité est de vivre en association symbiotique avec un champignon dont l'entretien, à l'intérieur du nid, est l'une de leurs activités principales. La nature du substrat fourni au champignon varie avec le degré d'évolution des fourmis. Si les genres les plus primitifs utilisent divers débris végétaux ou animaux tels que des fèces ou des carcasses d'insectes, les genres les plus évolués *Atta* et *Acromyrmex* entretiennent exclusivement leur champignon sur des fragments de végétal frais. Les fourmis découpent, nettoient le végétal, implantent des touffes de mycélium à sa surface (WEBER, 1957) et agencent l'ensemble en une structure spongiforme, couramment appelée meule ou jardin à champignon, qui abrite la vie de la société.

C'est MOLLER qui, le premier, décrit le champignon rencontré dans les nids d'*Acromyrmex discigera (= Atta discigera)* au Brésil en 1893. Il en précise les caractères microscopiques et décrit sa forme parfaite sous le nom de *Rozites gongylophora* Möller.

Dans les nids en activité, le champignon n'existe que sous sa forme végétative constituée uniquement de mycélium dont certaines extrémités portent des protubérances globuleuses. En fonction de leur forme, celles-ci ont été nommées «tête de chou-rave» (Kolrabiknöpfe) ou *gongylidia (γογγυλωδη* = chou-rave) par MOLLER, ou encore mycotêtes, vraisemblablement par analogie aux structures de champignon observées dans les galeries des termitières; elles sont groupées en amas denses ou *staphylae(* σταφυλη = grappe de raisin) au sein du mycélium.

L'enchevêtrement mycélien assure la cohésion des fragments végétaux entre eux et le maintien de la structure du nid. Pendant longtemps, le champignon a été considéré comme l'élément nutritif unique de la fourmi mais l'on sait maintenant que cette source alimentaire est complétée par un apport de substances végétales ingérées lors du découpage des fragments de plante (LITTLEDYKE, CHERRET, 1975). L'analyse chimique du champignon d'*Atta colombica tonsipes* Santschi (MARTIN et al., 1969) montre que 56% du poids sec du champignon sont utilisables comme éléments nutritifs; 27% de ce poids sec sont constitués par des glucides solubles, 13% par des acides aminés liés aux protéines, 4,5% par des acides aminés libres et 0,2% par des lipides.

Bien que des inconnues subsistent, l'étude de la symbiose attines-champignon (MARTIN, 1970) met en évidence une interdépendance des cycles de l'azote et du carbone des deux partenaires. Ainsi, le champignon assure une partie de la nutrition carbonée de la fourmi, mais celle-ci favorise la pénétration et l'activité cellulolytique du mycélium au sein des tissus végétaux par l'apport d'excrétions fécales (WEBER, 1941) contenant des systèmes enzymatiques actifs dans la dégradation de certains composés de la paroi cellulaire (MARTIN et al., 1973, 1975).

Le cycle de l'azote n'est encore que très partiellement élucidé. En effet, dans un premier temps, MARTIN (1970) a montré que l'utilisation des substrats azotés par le champignon est limitée à l'utilisation des acides aminés et des polypeptides de faible poids moléculaire et conclut que le liquide rectal de la fourmi, riche en acides aminés et protéinases, constitue précisément l'élément complémentaire du métabolisme déficient du champignon.

Or, récemment, MARTIN et al. (1975) montrent l'identité des protéinases du champignon et de la fourmi; il suggère, contrairement aux conclusions antérieures, qu'au sein de l'association mutualiste la fourmi ne ferait qu'assurer le transport des enzymes du champignon des zones de la meule denses en filaments mycéliens vers les zones de construction récente nouvellement implantées en mycélium.

Les formes végétatives des champignons cultivées par les différentes fourmis attines sont morphologiquement semblables, mais leur identification reste liée à l'observation de leur forme parfaite. Or, la formation rarissime du stade sexué dans la nature, sa constitution sur des nids abandonnés, la difficulté de son obtention in vitro (WEBER, 1957) font que sa détermination et son appartenance à une même espèce restent l'objet de discussions. Ainsi, selon HEIM (1957), le *Rozites gongylophora* Möller renommé *Leucocoprinus gongylophorus* par cet auteur serait le seul symbiote possible des fourmis de la tribu *Attini* et selon WEBER (1966), il se pourrait qu'il ne soit que l'un des partenaires possibles de l'alliance mutualiste parmi d'autres champignons susceptibles d'être domestiqués par les fourmis de la tribu.

Aussi, dans une étude préliminaire du champignon symbiote des fourmis attines évoluées *Atta* et *Acromyrmex*, il nous a paru intéressant de reprendre l'observation des caractères morphologiques de la forme végétative du cryptogame, d'en entreprendre l'étude cytologique in vitro et in situ en microscopie optique et de préciser les étapes de sa croissance.

MATÉRIEL

Nos études ont porté sur le champignon cultivé par *Acromyrmex octospinosus* (Reich), *Atta sexdens* (L.) et *Atta cephalotes* (L.). Le nid d'*Acromyrmex octospinosus* est originaire de Guadeloupe, celui d'*Atta sexdens* de Guyane et celui d'*Atta cephalotes* de Trinidad.

Le champignon est observé sur son support naturel ou à partir de cultures conduites sur milieu nutritif.

Les isolements sont effectués sur bouillon de carottes (400g de carottes pour 1l d'eau) gélosé à 2%, enrichi en hydrolysat de caséine Difco (5g), en glucose (30g), en extrait de levure Difco (1g), auquel on ajoute stérilement après autoclavage 200 unités de pénicilline et 200μg de streptomycine par ml de milieu.

Les cultures sont maintenues entre 26°C et 28°C. Les cultures d'entretien sont conduites sur milieu solide ou liquide statique, ne contenant pas d'anti-

biotique.

Quelques observations sont effectuées sur cultures sur lame réalisées dans une goutte de milieu carotte liquide ou gélosé.

Les prélèvements sont réalisés de façon à permettre l'observation de toutes les zones de culture.

TECHNIQUES

Outre l'observation vitale, l'essentiel des observations s'effectue sur coupes de matériel inclus dans la paraffine selon la technique classique que nous ne détaillerons pas. Nous insisterons sur les méthodes de fixation et de coloration choisies.

1. - *Observation vitale :*

Le montage dans le rouge neutre à 1 p. 1000 dans l'eau physiologique ou le liquide de Ringer rend aisée l'observation du matériel vivant, en particulier cela permet de noter l'aspect morphologique général et d'enregistrer ses mensurations sans qu'il y ait de perturbations par les fixateurs. A cette concentration, le rouge neutre se fixe électivement au niveau des vacuoles et permet de distinguer les régions peu vacuolisées en voies d'expansion, des régions riches en vacuoles de grande taille ayant terminé leur phase de croissance.

2. - *Mise en évidence des noyaux :*

Les réactions obtenues après application de la réaction nucléale de Feulgen sur divers cryptogames sont très variables selon les auteurs. Si HEIM P. (1971) utilise avec succès cette technique pour l'étude des noyaux des principaux groupes systématiques de champignons, d'autres auteurs obtiennent des colorations hétérogènes, négatives ou trop pâles : (DOGUET, DEFRANCE, SCANNERIN cités par SCHRANTZ, 1970).

La réaction de Feulgen est négative sur notre matériel, tant après fixation par le liquide de Navachine que par le liquide de Helly, et quel que soit le temps d'hydrolyse. L'hématoxyline de Regaud donne de bonnes colorations après fixation au liquide de Navachine. Une hydrolyse de 10 minutes par l'acide chlorhydrique normal à 60°C permet d'améliorer le contraste en réduisant la capacité de coloration du cytoplasme. Les meilleures préparations sont obtenues en appliquant la coloration au «nuclear fast red» extraite de la technique de BENES et KAMINECK (1973) utilisée par ailleurs pour la mise en évidence de l'ARN et détaillée ci-dessous. Le matériel est traité au glutaraldéhyde à 3% selon le procédé de fixation habituellement destiné à la microscopie électronique. Les réactions positives du cytoplasme sont éliminées par un traitement à la RNase d'une durée de 60 minutes à 40°C.

3. - Mise en évidence de l'ARN :

La méthode de Brachet au vert de méthyle pyronine contrôlée par la RNase classiquement utilisée après fixation au F.A.A. (formol, alcool 90°, acide acétique) pour mettre en évidence la richesse en ARN, ne peut être retenue pour ce champignon car les structures sont mal conservées par le fixateur.

La méthode au «nuclear fast red» et bleu alcian de BENES et KAMINECK (1973) utilisée avec succès par SCHRANTZ sur le *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev. donne des préparations satisfaisantes, sur échantillons fixés au glutaraldéhyde à 3%.

Selon les auteurs, le «nuclear fast red» colore les noyaux en rouge, le cytoplasme en rose pâle et le bleu alcian teinte les parois en bleu. Bien que cette coloration ne soit pas spécifique de l'ARN, SCHRANTZ constate que les régions méristématiques du *Xylaria polymorpha* riches en ARN et à parois minces sont fortement teintées en rouge, le bleu des parois passant inaperçu chez les cellules jeunes, tandis que les hyphes âgées à parois épaisses et à faible teneur en ARN présentent une teinte bleue dominante. La technique est la suivante : après un passage dans l'eau acétique à 3%, les préparations sont colorées une heure au bleu alcian en solution à 0,1% dans de l'eau acétique, rincées à l'eau acétique et colorées 10 minutes au «nuclear fast red» à 0,1% dans du sulfate d'aluminium à 5%. Un contrôle est effectué en traitant les préparations à la RNase dans les conditions déjà indiquées.

4. - Mise en évidence du glycogène :

La recherche du glycogène peut être réalisée simplement par montage entre lame et lamelle des structures à observer dans une goutte de Lugol. Le cytoplasme prend alors une teinte brun acajou plus ou moins intense et plus ou moins homogène selon la densité et la répartition du glycogène.

Le glycogène est aussi localisé, après fixation par le mélange de Gendre (solution saturée d'acide picrique dans l'alcool à 90° : 80ml - formol: 15ml - acide acétique: 5ml), par la réaction de Bauer qui le colore en rose vif.

La solubilité du glycogène justifie aussi son traitement en milieu anhydre. Nous avons pour cela partiellement suivi le procédé Mancini cité par LISON. Les coupes fixées au liquide de Gendre et déparaffinées au xylène sont recouvertes d'une solution saturée à froid d'iode métalloïdique et observées dans le liquide de montage. Après macération pendant 6 heures, nos coupes présentent une coloration brune dont la localisation est similaire à celle obtenue avec les autres techniques.

5. - Mise en évidence de la métachromatine :

Plusieurs colorants sont susceptibles de révéler la métachromasie des polyphosphates vacuolaires, en particulier le bleu de toluidine et l'azur II. Les images les plus contrastées sont obtenues après fixation au mélange de Zenker (chlorure

mercurique: 0,5g - bichromate de potassium: 0,25g - sulfate neutre de sodium: 0,1g - acide acétique cristallisable: 0,05ml - H_2O: 10ml), et d'une coloration à l'azur II à 0,05% dans du tampon à pH 4 dilué au 1/5 dans l'eau.

Les inclusions métachromatiques sont rouge sombre alors que le cytoplasme et les parois sont bleues.

6. - Mise en évidence des lipides :

Une coloration au rouge Soudan III ou au noir Soudan B en solution saturée dans l'alcool à 70°, est appliquée sur échantillon fixé au formol-calcium de Baker (formol à 40%: 1ml - $CaCl_2$ à 10%: 1ml - H_2O: 8ml) pendant 24 heures. L'observation est faite directement sur un écrasement monté entre lame et lamelle dans le colorant.

RÉSULTATS

Dans cette étude, nous nous sommes attachées à décrire les caractères morphologiques et cytologiques du champignon symbiote des trois espèces de fourmis déjà citées, sans considérer la dynamique de la colonisation du végétal par le champignon.

1. - Étude in vitro du champignon :

a) Étapes de la croissance du champignon et étude morphologique :

L'aspect cultural des divers isolats de ces champignons est tout à fait comparable. Quel que soit l'âge de la culture, toutes les colonies développées sur milieu gélosé présentent un aspect en oeuf sur le plat. Le mycélium est blanc, dense et d'aspect velouté. Dans la partie superficielle, on distingue la masse compacte blanche des *staphylae* jeunes qui naissent isolément ou en plaques. Le revers de la zone mamelonnée centrale devient rapidement beige ou brun et de consistance coriace. Dans nos conditions de cultures, la vitesse de croissance varie de 0,2 à 0,7mm par jour, en étant située, pour la majorité des colonies, aux environs de 0,4 à 0,5mm par jour (celle-ci pouvant varier d'un isolat à l'autre pour le champignon d'un même nid). Ces chiffres sont du même ordre que ceux cités par WEBER (1972) qui, en fonction des isolats et des milieux de culture, note une vitesse de croissance de 0,1 à 0,67mm par 24 heures.

Les cultures en milieu liquide se développent strictement en surface, formant des plaques blanches mamelonnées à revers coriace plus ou moins foncé, dont l'aspect général rappelle celui des cultures sur milieu gélosé.

On peut aisément définir les étapes de la croissance du champignon en observant l'évolution dans le temps d'une colonie sur milieu gélosé. On définit ainsi 5 zones que l'on désigne A, B, C, D, E (Fig. 1).

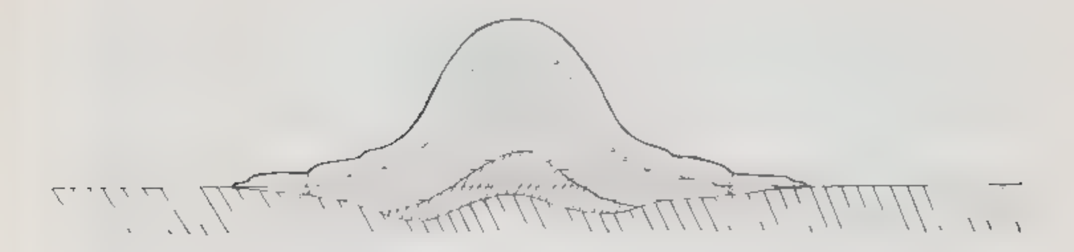


Fig. 1. Schéma d'une colonie du champignon symbiote d'*Acromyrmex octospinosus*, d'un mois sur milieu gélosé (F.).
Mycélium du front de culture : zone A: colonisation du milieu, zone B: croissance du mycélium aérien. Zone C: couche superficielle de différenciation des *gongylidia*. Zone D couche médiane d'empilement et d'entassement des structures. Zone E: couche pseudo-stromatique

- La zone A, de 0,5 à 1mm de large, représente le front de culture sensu stricto. Elle est constituée d'hyphes à croissance radiale développées dans la couche superficielle du milieu. Leur étude sur les coupes est délicate car leur fréquence est peu élevée et elles n'apparaissent que sous forme de tronçons dont la localisation par rapport à l'apex est difficilement repérable. Les cultures sur lames montrent que ce sont des hyphes fines de section régulière de 3 à 4µm à cytoplasme dense.

- La zone B, située immédiatement en arrière de la zone A, s'étend sur 3 à 5mm. Elle diffère de la précédente par le développement d'hyphes aériennes sur une épaisseur de 1 à 2mm. Elle est constituée de l'enchevêtrement lâche de filaments fins et d'une proportion plus importante de filaments à divers stades de vacuolisation au cheminement irrégulier et coudé. Ces derniers présentent des épaississements ou des boursouflures localisés ou non au niveau des grosses vacuoles, leur section moyenne de 6 à 8µm peut atteindre 10 à 12µm au niveau des hypertrophies

- La zone C est la zone de différenciation des *staphylae*. Elle est formée d'une couche de mycélium densément enchevêtré, surmontée d'une couche plus lâche où se constituent en abondance les *gongylidia* (Pl. II). Ceux-ci se forment sur des diverticules d'hyphes plus ou moins longs qui naissent perpendiculairement au filament d'origine et n'en sont jamais séparés par une cloison. Certains articles terminaux portent ainsi plusieurs *gongylidia*. Un *gongylidium* se constitue par une dilatation progressive de l'apex d'un diverticule. En effet toutes les formes intermédiaires entre une ramification en massue courte et une dilatation apicale sphérique située à l'extrémité d'un long filament grêle ou irrégulièrement renflé, sont visibles sur les préparations microscopiques. La vacuolisation évolue vers la constitution d'une unique vacuole occupant toute la lumière de la partie sphérique (Fig. 2). Quelle que soit l'origine du champignon, le diamètre des *gongylidia* sphériques s'étend de 35 à 60µm avec une dimension moyenne de 45µm. Les *staphylae* n'ont pas de structure organisée

comparable à celle des formes conidiennes de certains champignons. Apparemment, les *gongylidia* sont seulement groupés dans l'espace en régions privilégiées de différenciation. Parmi ces *gongylidia* à divers stades d'évolution on peut également observer en abondance les formes myceliennes déjà décrites.

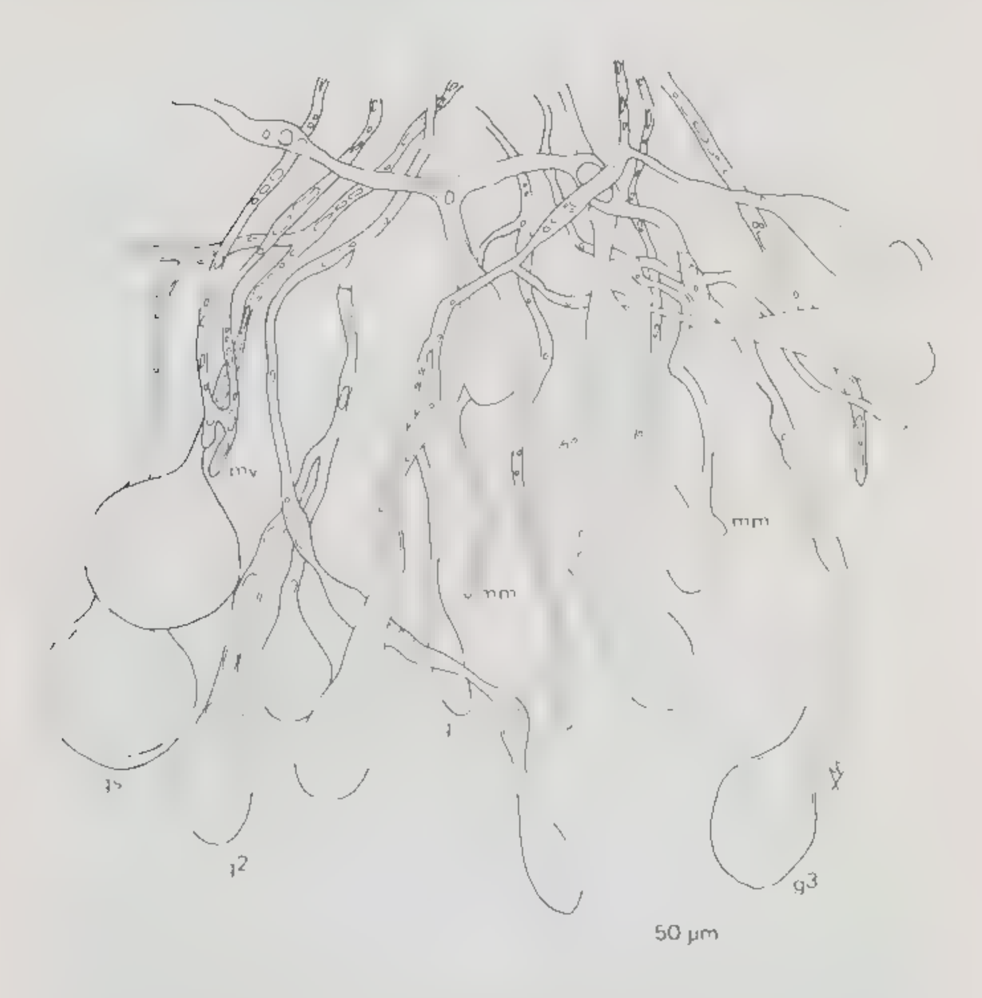


Fig. 2. — Fragment d'un *staphylae* en cours de formation présentant du mycélium méristématique (mm), du mycélium vacuolisé (mv) ayant terminé sa phase d'expansion, des *gongylidia* à divers stades d'évolution (g1, g2, g3) dont le stade ultime (gs) présente une vacuole sphérique occupant toute la lumière de la partie apicale.

- Le mamelon central présente une partie superficielle homologue de la zone C. La partie sous jacente ou zone D présente un lacis plus ou moins lâche de mycélium âgé et de *gongylidia* ovoïdes ou sphériques. Cette partie centrale

de la culture semble donc formée de la superposition de diverses couches dues au tassement progressif des structures sans cesse recouvertes par des structures jeunes.

- Dans la zone E, ou couche inférieure de la colonie, l'imbrication et le tassement des structures sont tels que l'on ne différencie pas les *gongylidia* aplatis des hyphes.

b) Étude cytologique :

Le mycélium est divisé en articles de dimensions variables de l'ordre de 40 à 100µm, les cloisons étant plus fréquentes dans le mycélium âgé. Comme pour beaucoup de champignons, les articles apicaux sont longs et peuvent atteindre 180 à 200µm.

Divers colorants se fixant en particulier sur les constituants protéiques tels que l'hématoxyline de Regaud, le «nuclear fast red», l'azur II, font apparaître au centre de la cloison une formation lenticulaire fortement colorée à l'emplacement des dolipores caractéristiques des Basidiomycètes (BECKETT et al., 1974). Ces formations ont été récemment mises en évidence sur les coupes ultrastructurales du champignon symbiote d'*Acromyrmex octospinosus*, par ANGELI-PAPA (1979). Au niveau des cloisons, aucune anse d'anastomose n'est observée comme c'est le cas chez de nombreux Basidiomycètes. WEBER (1972) les a observées en abondance chez le champignon d'une fourmi inférieure, *Apterostigma*, mais exceptionnellement chez les champignons d'autres fourmis. Par contre, des anastomoses entre fragments d'hyphes parallèles sont fréquentes, elles s'effectuent par un pont perpendiculaire aux hyphes sans formation de cloison.

Les articles mycéliens et les *gongylidia* contiennent de nombreux noyaux (Pl. I, fig. 1). Sur les quelques articles du mycélium visibles sur toute leur longueur dans les coupes, nous avons pu en compter de 6 à 12. Dans les *gongylidia* les noyaux très nombreux se répartissent dans la partie filamenteuse et dans la partie dilatée (Pl. I, fig. 2). Dans celle-ci, ils sont plaqués le long de la paroi par la vacuole centrale et situés dans les régions basale et apicale.

Les noyaux colorés à l'hématoxyline de Regaud ou au «nuclear fast red» ont une forme ovale et des dimensions équivalentes de l'ordre de 3,5 x 4,2µm. Dans les parties méristématiques, de petits noyaux mesurant 1,8 x 2,4µm et fréquemment associés deux à deux représentent vraisemblablement les noyaux fils issus de divisions nucléaires récentes. Le «nuclear fast red» donne une coloration uniforme des noyaux, l'hématoxyline de Regaud permet de déceler un réseau de chromatine plus ou moins diffus, mais seules les coupes colorées à l'hématoxyline de Wittmann et observées en contraste de phase nous ont permis d'évaluer le nombre de chromocentres à 4.

La coloration de Benes et Kamineck met en évidence le passage de l'état méristématique à l'état de senescence. Cette évolution est visible dans la partie superficielle de la culture, elle s'effectue, en se basant sur la vitesse de croissance du champignon, en 3 à 8 jours. Seules quelques structures au cytoplasme rose

vif et aux parois peu distinctes, manifestent une activité méristématique importante : ce sont essentiellement les articles apicaux des hyphes rencontrées dans les zones A, B et C et les *gongylidia* en cours d'évolution. Les articles mycéliens apicaux, refoulés par le processus de croissance terminale des filaments, perdent rapidement leur caractère méristématique.

Le cytoplasme, d'abord riche en ARN, se vacuolise progressivement tandis que les parois s'épaississent et prennent une coloration bleue accentuée. L'évolution des *gongylidia* est similaire. L'augmentation de volume s'accompagne d'une intense activité cytoplasmique révélée par la capacité de coloration du cytoplasme, puis d'une vacuolisation importante alors que les parois deviennent bleues. La phase de stabilisation des formes ovoïdes ou sphériques fortement vacuolisées s'accompagne d'une perte de l'aptitude du cytoplasme à se colorer : ainsi, les *gongylidia* déjà recouverts par une nouvelle vague de mycélium apparaissent bleus.

Le matériel de réserve est essentiellement constitué chez ce champignon par du glycogène. En effet, la richesse en lipides est très faible, seulement quelques fins granules chromophiles apparaissent dispersés au sein du cytoplasme du mycélium et des *gongylidia*. En revanche, le cytoplasme apparaît rempli de granules de glycogène et bien que la coloration de Bauer ne révèle pas les parois, la densité des granules est suffisante pour que l'on retrouve aisément la silhouette du mycélium et des *gongylidia* qui les contiennent (Pl. III, fig. 1 et 2). L'agglomération du glycogène la plus intense s'effectue dans la couche superficielle du mycélium qui précède l'élaboration des *gongylidia*, alors que la coloration plus pâle des zones profondes laisse supposer que le mycélium se vide en partie au cours du processus de sénescence (Pl. II). Cependant, la capacité de coloration des chapelles des *gongylidia* met en évidence l'élaboration du glycogène, ou son transfert des zones sous-jacentes vers les zones jeunes, dès les premiers stades de la croissance végétative.

On notera également la présence des polyphosphates, révélés par leurs propriétés métachromatiques, renfermés en abondance dans tout le système vacuolaire et dont les granules occupent fréquemment toute la lumière des vacuoles (Pl. III, fig. 3 et 4). Ces polyphosphates, dont le rôle n'est pas totalement élucidé, peuvent cependant être considérés comme des matériaux en attente susceptibles de participer à certaines synthèses cellulaires.

Il apparaît donc qu'en culture, les *gongylidia* se constituent toujours à une courte distance du front de culture sur du mycélium jeune, lui-même développé à la surface des premières couches de filaments sénescents. Le développement d'une certaine masse mycélienne, correspondant vraisemblablement à l'élaboration d'une quantité suffisante de réserves nutritives, semble donc précéder nécessairement la constitution des formes en massue.

2. - Étude in situ du revêtement mycélien de la meule :

L'interprétation des coupes pratiquées in situ est moins aisée que celle des coupes réalisées sur les cultures en boîte de Pétri, en raison de l'activité de ré-

colte des fourmis et du remaniement continuel du champignon dans la meule

Dans les zones actives d'une meule le champignon est constitué d'un réseau dense de mycélium unissant les fragments végétaux entre eux et comportant de place en place des zones de différenciation des *gongylidia* (Pl. IV, fig 1 et 2) L'essentiel de la masse mycélienne se développe à la surface des fragments végétaux, les hyphes ne paraissant coloniser les tissus qu'à partir d'un certain stade de dégradation du végétal Les caractéristiques morphologiques, cytologiques les dimensions du mycelium et des *gongylidia* sont, à stades évolutifs équivalents, comparables à celles des mêmes structures observées en culture in vitro.

La trame mycélienne traitée par la coloration de Benes et Kaminek réagit par une coloration bleu quasi générale, traduisant une activité cytoplasmique restreinte, seules quelques structures de surface présentent localement un caractère méristématique. La coloration de Bauer montre que la teneur en glycogène de cette couche de mycélium est variable au sein de ce revêtement mycélien Cet ensemble de caractères suggère qu'il se produit, comparativement à l'évolution des colonies cultivées in vitro, un vieillissement de la couche profonde de mycélium et une régénération de surface.

Les zones de différenciation des *gongylidia* sont essentiellement des zones de structures juvéniles dont le caractère est illustré par la vacuolisation non achevée et la forte concentration en ARN de la plupart des filaments mycéliens et des *gongylidia*.

Les *gongylidia*, jeunes, sont riches en glycogène Les *gongylidia* les plus évolués, à tête sphérique, semblent moins fréquents qu'en culture in vitro Ce dernier point peut laisser supposer qu'il existe un stade de récolte préférentiel de la part des fourmis.

Cette hétérogénéité du développement du champignon au niveau du substrat peut vraisemblablement s'expliquer par l'activité de récolte de la fourmi dont les incessants prélèvement sont suivis d une phase de régénération superficielle du cryptogame au niveau des sites de récolte.

DISCUSSION

Nos observations montrent la correspondance des renseignements recueillis au niveau de la meule sur le support naturel du champignon et dans nos conditions de culture. Elles mettent aussi l'accent sur la similitude des caractères culturaux, morphologiques, cytologiques étudiés, malgré l'origine différente des champignons Nos observations sont en accord avec celles de MOLLER (1893) réalisées sur le champignon d'*Acromyrmex discigera* et celles de WEBER (1972) effectuées sur le champignon symbiote de nombreuses fourmis attines de niveaux évolutifs différents, et se trouvent confirmées par l'étude ultrastructurale du champignon d'*Acromyrmex octospinosus* réalisée par ANGELI PAPA (1979).

Bien que la détermination des champignons soit basée sur les caractères de la forme parfaite et tienne rarement compte de ceux de la forme végétative, la concordance de nos observations morphologiques et cytologiques nous amène à penser que le champignon entretenu par les trois espèces d'attines étudiées, appartient à la même forme parfaite. Notons que le nombre de chromocentres correspond au nombre chromosomique du genre *Lepiota*, 2n = 8 étudié par P. HEIM (1971).

Nos observations ne permettent pas d'attribuer aux *gongylidia* un rôle particulier dans le cycle du champignon. Ils ne semblent pas représenter l'ébauche de spores car ils ne comportent aucun détail anatomique permettant d'assurer leur dispersion. Par contre, leur forme générale, leur taille, la présence de nombreux noyaux dans la partie apicale peuvent évoquer les basides avortées d'un hyménium rudimentaire.

La mise en évidence du glycogène est en désaccord avec les résultats de l'analyse du champignon réalisée par MARTIN et al. (1969) qui ne révèle que la mise en réserve de sucres simples. Cependant, la présence de ce polyoside vient s'inscrire dans le schéma général des relations symbiotiques dont certaines étapes ont été élucidées par ce même auteur et selon lesquelles, rappelons-le, le champignon constituerait la source d'alimentation essentielle de la fourmi. L'ingestion de glycogène, en revanche, pose le problème de sa dégradation enzymatique dans le système digestif de la fourmi. Or, selon MARTIN et al. (1975), les enzymes actives sur les polysaccharides mises en évidence dans l'intestin des fourmis n'auraient aucun rôle de digestion interne; évacuées dans le liquide rectal, elles n'auraient qu'un rôle externe préparatoire à la colonisation du végétal par le champignon. La présence de α-1,4 glycosidase dans l'intestin moyen de la fourmi n'est pas suffisante pour expliquer la dégradation du glycogène; d'autres études enzymologiques sont donc nécessaires pour éclairer la métabolisation de ce composé.

En contribuant à une meilleure connaissance générale du champignon cultivé par quelques fourmis attines, nos travaux permettent aussi d'orienter, vers des voies nouvelles, la réflexion sur les relations fourmi-champignon.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont à Monsieur SCHRANTZ, Maître Assistant à la Faculté des Sciences de Paris dont les conseils ont guidé notre choix des techniques cytologiques; à Monsieur KERMARREC, Directeur de la Station de Zoologie et de Lutte Biologique de l'Institut National Agronomique des Antilles et de la Guyanne pour l'envoi des nids d'*Acromyrmex* et la participation financière qu'il nous a prodiguée ; à Madame BAZIRE-BENAZET qui nous a permis d'isoler de ses élevages le champignon symbiote d'*Atta sexdens* et d'*Atta cephalotes*.

BIBLIOGRAPHIE

ANGELI PAPA J., 1979 – Le champignon cultivé par la «Fourmi-manioc» *Acromyrmex octospinosus* (Reich) en Guadeloupe, résultats préliminaires sur le mycélium en culture pure et sur l'infrastructure des hyphes. *C R. Acad. Sc. Paris*, 289 21 24.

BECKETT A, HEATH I B., Mc LAUGHLIN D.J., 1974 – An Atlas of Fungi Ultrastructure · 181-199; Longman, London

BENES K. et KAMINEK M, 1973 – The use of nuclear fast red in Plant material successively with Alcian Blue. *Biologia Plantarum* 15: 294-297.

HEIM P., 1971 Le noyau dans la vie du champignon. *Ann. Sc. Nat. et Biol. Vég* 12. XII, 4: 465-514

HEIM R, 1957 A propos du *Rozites gongylophora* A. Moller. *Rev. de Mycol.* XXII, 3. 293 299

LITTLEDYKE M., CHERRETT J.M., 1975 – Variability in the selection of substrate by the leaf cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). *Bull. ent Res.* 65: 33-47.

LISON L., 1960 Histochimie et cytochimie animales, 2 vol., 842 p., 3e éd. Gauthiers Villars, Paris.

MARTIN M, 1970 – The biochemical bases of the fungus-Attine ant symbiosis *Science* 169: 16-20.

MARTIN M., 1974 Biochemical ecology of the Attine ants. *Accounts of the chemical Research* 7 1 5.

MARTIN M., BOYD N D., GIESELMANN M J., SILVER R G., 1975 Activity of faecal fluid of leaf-cutting ants toward plant cell wall polysaccharides. *J. Insect physiol.* 21 1887-1892

MARTIN M., CARMAN R., MAC CONNELL J, 1969 - Nutrients derived from the fungus cultured by the fungus growing-ants *Atta colombica tonsipes. Ann. Entomol Soc Amer.* 62 11 13.

MARTIN M., GIESELMANN M.J., MARTIN J.S., 1973 – Rectal enzymes of Attine ants · Amylase and chitinase. *J. Insect. Physiol.* 19: 1409 1411.

MARTIN M., MARTIN J.S., 1970 – The biochemical basis for the symbiosis between the ant *Atta colombica tonsipes* and its food fungus. *J. Insect physiol.* 16: 109-119

MARTIN M, MARTIN J S., 1971 The presence of protease activity in the rectal fluid of primitive Attine ants *J Insect Physiol* 17: 1897-1906.

MOLLER A., 1893 Die pilzgarten einiger sudamerikanischer Ameisen. Schimper's Bot Mitt. aus den Tropen, 6, VII: 1-127.

SCHRANTZ J P., 1970 Étude cytologique en microscopie optique et électronique de quelques Ascomycetes. I. Le noyau. *Rev. Cytol. et Biol. Vég.* 33: 1-100.

SCHRANTZ J P, 1977 Morphogénèse et ultrastructure du stade conidien de *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev. *Rev. Myc.* 41. 135-169.

WEBER Neal A., 1957 – Fungus-growing Ants and their Fungi *«Cyphomyrmex costatus» Ecology* 38: 480-494.

WEBER N.A., 1941 – The Biology of the Fungus growing Ants. Part VII, «The Barro Colorado Island, Canal Zone, specus». *Revista Entomol.* 12: 93-130

WEBER N A, 1966 - The fungus-growing ants. *Science* 153: 587-604

WEBER N.A., 1972 – Gardening ants. The attines. Mem. of the American Phuosophical Society

LÉGENDES DES PLANCHES

Planche I

Fig. 1 : Noyaux des articles mycéliens du champignon symbiote d'*Atta sexdens*. Fixation au glutaraldéhyde. Coloration au «nuclear fast red». x 1750. — Fig. 2 : Noyaux plaqués contre la paroi d'un jeune *gongylidium* du champignon d'*Atta sexdens*. Fixation au glutaraldéhyde, coloration au «nuclear fast red». x 3000.

Planche II

Aspect général d'une coupe effectuée dans la couche superficielle d'une culture du champignon symbiote d'*Acromyrmex octospinosus* montrant la localisation du glycogène. Noter la concentration du glycogène dans la zone C (ZC) en particulier dans la couche mycélienne de base (M) et dans les *gongylidia* (g) en cours de formation. Les derniers étages de la zone D (ZD), réagissant peu à la coloration de Bauer, manifestent l'épuisement de la couche profonde en substances de réserve. Fixation de Gendre, coloration de Bauer, x 195.

Planche III

Fig. 1 et 2. Détails de *gongylidia* du champignon d'*Acromyrmex octospinosus* montrant que la concentration en corpuscules de glycogène est dense dès les premiers stades de la formation des *gongylidia* (fig. 1) et qu'elle s'estompe au cours de la vacuolisation (fig. 2). Fixation de Gendre, coloration de Bauer, x 1200. — Fig. 3 et 4. Corpuscules métachromatiques présents en abondance dans le système vacuolaire du mycélium (fig. 3) et d'un *gongylidium* (fig. 4) du champignon symbiote d'*Acromyrmex octospinosus*. Fixateur de Zenker, coloration à l'Azur II, Fig. 3 : x 1400; Fig. 4 : x 1200.

Planche IV

Coupes dans une meule d'*Atta cephalotes*. — Fig. 1. Trame de mycélium (m) ayant envahi les interstices entre les fragments végétaux (v). — Fig. 2. Site de développement des *gongylidia* (g). Fig. 1 et 2. Fixation au glutaraldéhyde, coloration de Benes et Kaminek, x 350. Cette coloration ne permet pas de distinguer sur les photographies en noir et blanc les filaments et les *gongylidia* à caractère méristématique des filaments âgés constituant l'essentiel de la masse de mycélium.

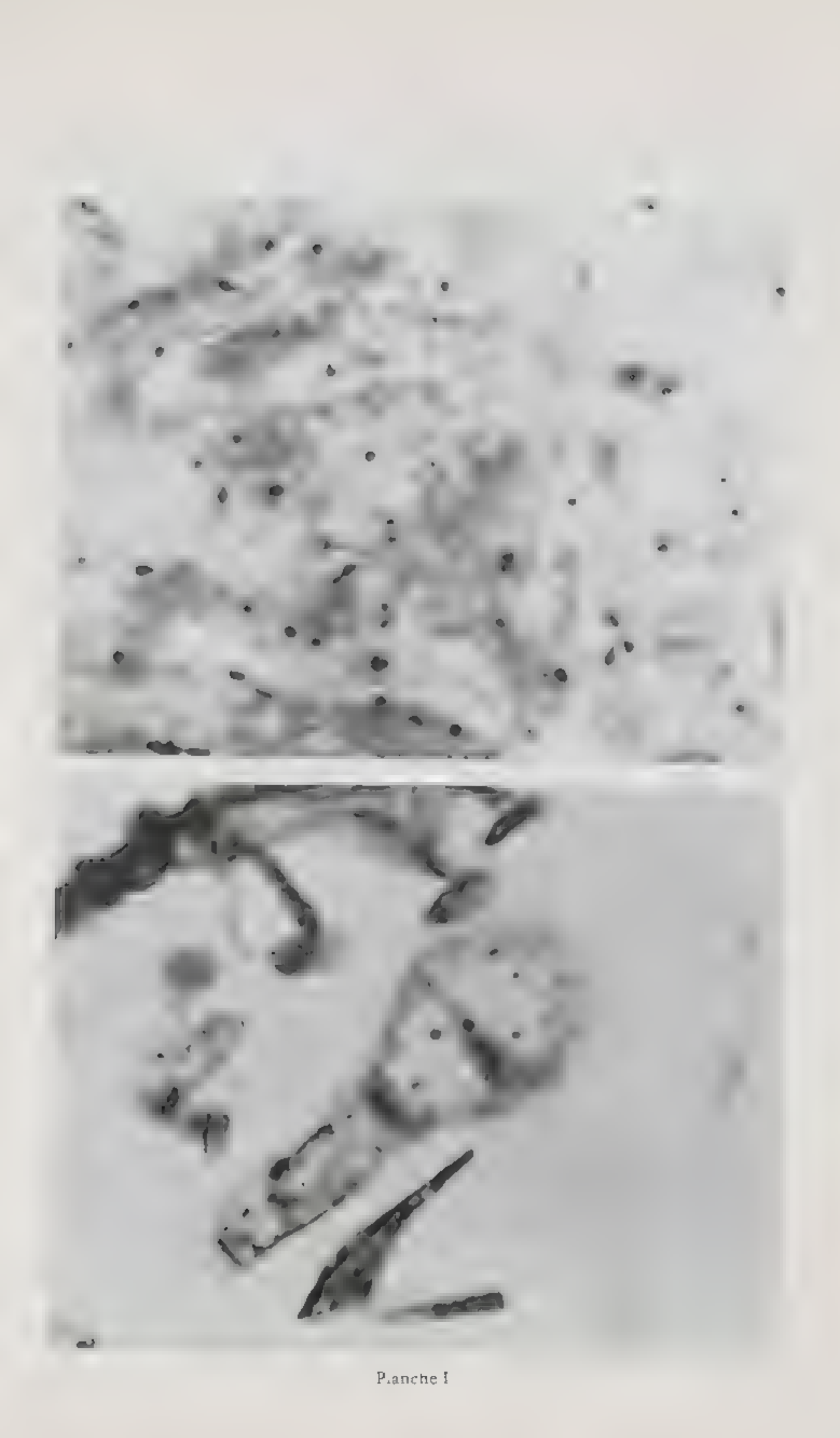


Planche I

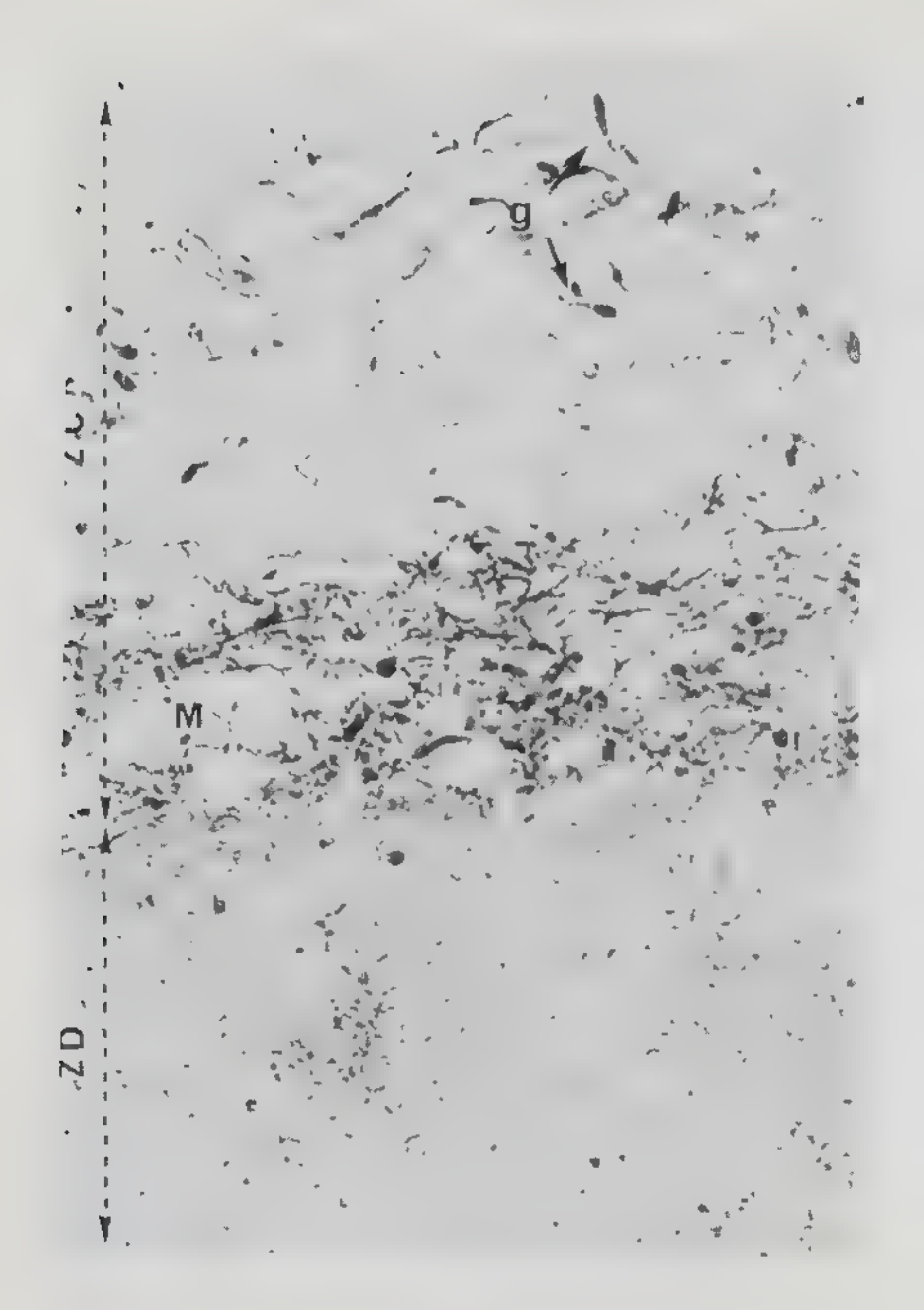


Planche II

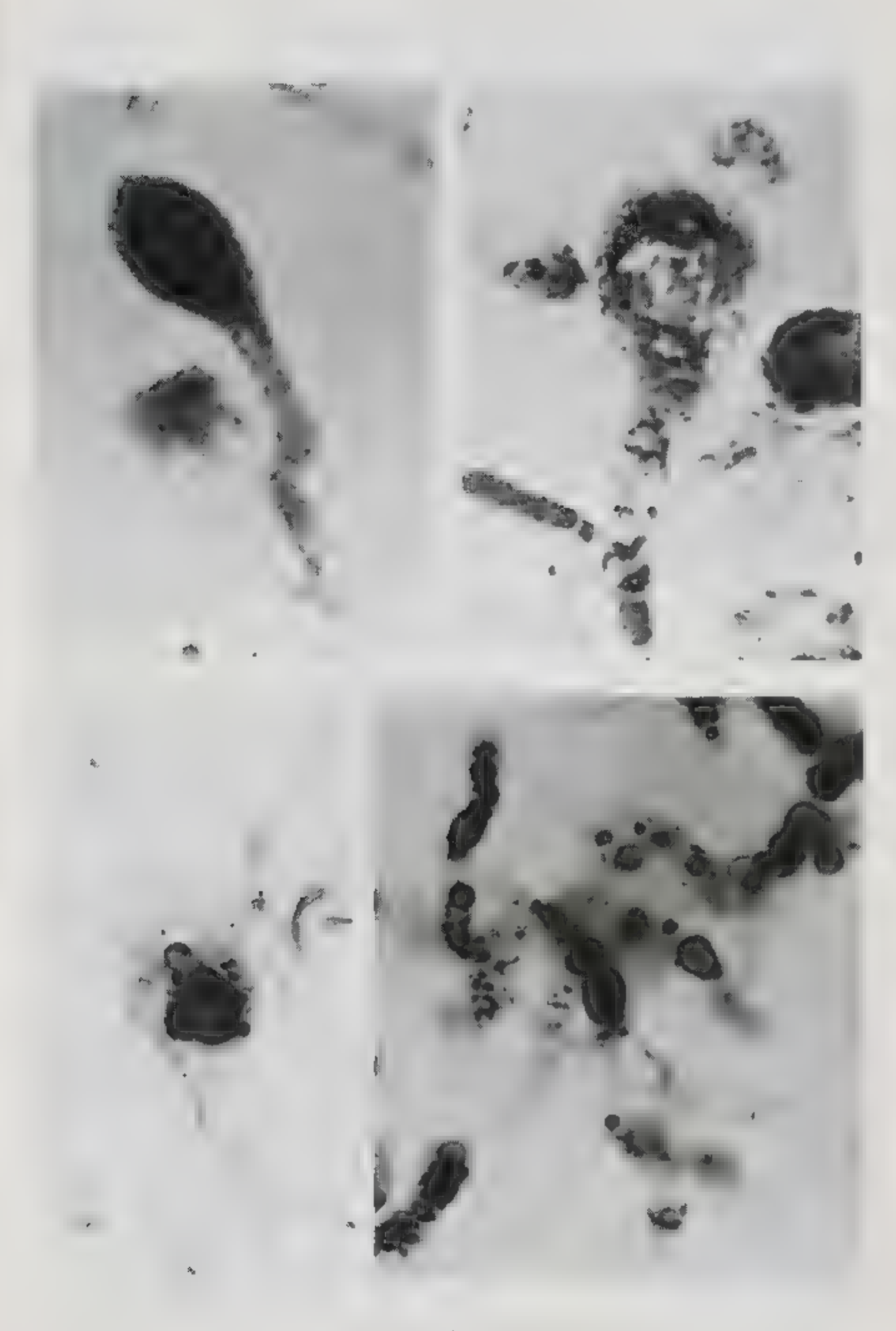


Planche III

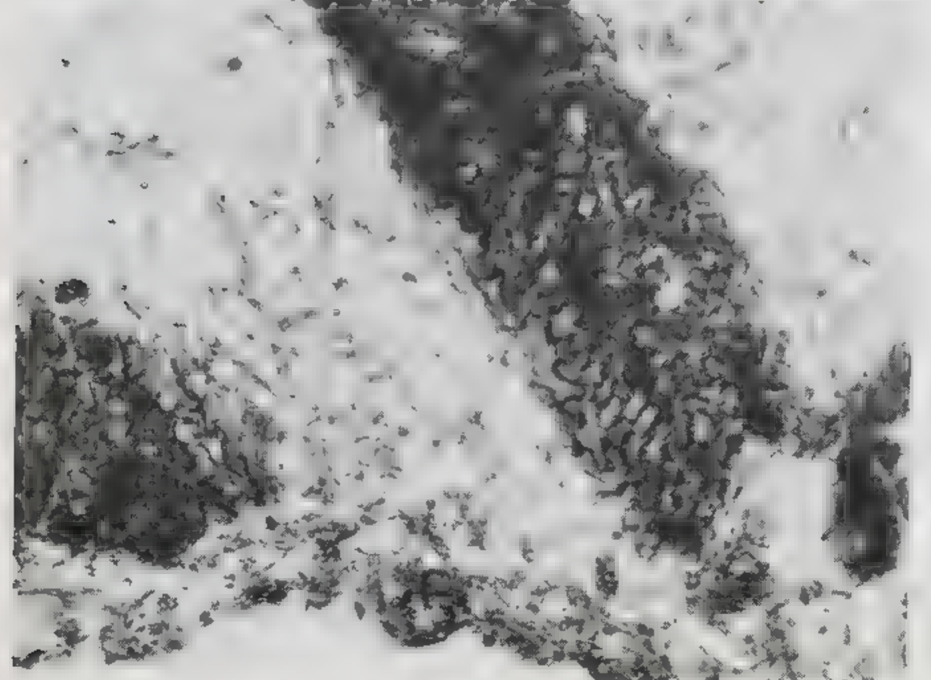


Planche IV